

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

06.08.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 8 月 1 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 2 9 1 0 6 0
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 2 9 1 0 6 0]

出 願 人
Applicant(s): 呉羽化学工業株式会社
 向田 直史
 藤井 千文

REC'D 24 SEP 2004

WIPO

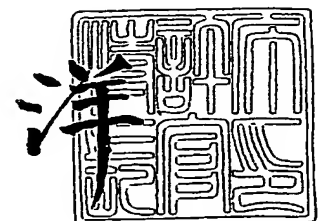
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 9 月 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【発明者】
【発明者】
【提出日】
【あて先】
【国際特許分類】
特許願
0701011001
平成15年 8月11日
特許庁長官 殿
C07H
C07K
C12P
C12Q

【発明者】
【住所又は居所】
【氏名】
石川県金沢市平和町三丁目17番1号 平和宿舍L58-32
向田 直史

【発明者】
【住所又は居所】
【氏名】
石川県金沢市もりの里三丁目39番 ベル・ビューI-106号
藤井 千文

【発明者】
【住所又は居所】
【氏名】
東京都練馬区春日町四丁目8番16号
広瀬 国孝

【特許出願人】
【識別番号】
【氏名又は名称】
000001100
呉羽化学工業株式会社

【特許出願人】
【住所又は居所】
【氏名又は名称】
石川県金沢市平和町三丁目17番1号 平和宿舍L58-32
向田 直史

【特許出願人】
【住所又は居所】
【氏名又は名称】
石川県金沢市もりの里三丁目39番 ベル・ビューI-106号
藤井 千文

【代理人】
【識別番号】
【弁理士】
【氏名又は名称】
100097456
石川 徹

【手数料の表示】
【予納台帳番号】
【納付金額】
094216
21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】
【物件名】
【物件名】
【物件名】
特許請求の範囲 1
明細書 1
図面 1
要約書 1

【請求項】特許請求の範囲

【請求項 1】

配列番号 1 のアミノ酸配列に対し、少なくとも 80% の相同性を有し；配列番号 1 のアミノ酸配列に対応して、少なくとも N-末端から 39、84、296 又は 300 番目のアミノ酸残基が Ala、85 番目のアミノ酸残基が Thr、163 又は 333 番目のアミノ酸残基が Ser、195 又は 257 番目のアミノ酸残基が Leu、271 番目のアミノ酸残基が Arg、297 番目のアミノ酸残基が Asp、313 番目のアミノ酸残基が Pro、又は 316 番目のアミノ酸残基が Val であるアミノ酸配列を有し；かつ配列番号 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対する抗体産生を誘導する免疫原性を有する、ポリペプチド。

【請求項 2】

相同性が少なくとも 90% である、請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 3】

相同性が少なくとも 9.5% である、請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 4】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項 5】

配列番号 1 のアミノ酸配列の部分配列；又は配列番号 1 のアミノ酸配列に対し、少なくとも 80% の相同性を有し、かつ配列番号 1 のアミノ酸配列に対応して、少なくとも N-末端から 39、84、296 又は 300 番目のアミノ酸残基が Ala、85 番目のアミノ酸残基が Thr、163 又は 333 番目のアミノ酸残基が Ser、195 又は 257 番目のアミノ酸残基が Leu、271 番目のアミノ酸残基が Arg、297 番目のアミノ酸残基が Asp、313 番目のアミノ酸残基が Pro、又は 316 番目のアミノ酸残基が Val であるアミノ酸配列の部分配列を有し；かつ請求項 4 のポリペプチドに対する抗体産生を誘導する免疫原性を有する、ポリペプチド断片。

【請求項 6】

請求項 1、又は 4 記載のポリペプチド、又は請求項 5 のポリペプチド断片からなる群から選ばれる少なくとも 1 を含む、請求項 4 のポリペプチドに対し特異的な抗体製造用組成物。

【請求項 7】

請求項 6 記載の組成物を、哺乳類に投与することを含む、請求項 4 のポリペプチドに対する抗体の製造方法。

【請求項 8】

請求項 4 記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 9】

該抗体が、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体である、請求項 8 記載の抗体。

【請求項 10】

請求項 8 記載の抗体を含む、肝臓ガン、又は肝臓前ガン状態診断用キット。

【請求項 11】

配列番号 1 のアミノ酸配列に対し、少なくとも 80% の相同性を有し；配列番号 1 のアミノ酸配列に対応して、少なくとも N-末端から 39、84、296 又は 300 番目のアミノ酸残基が Ala、85 番目のアミノ酸残基が Thr、163 又は 333 番目のアミノ酸残基が Ser、195 又は 257 番目のアミノ酸残基が Leu、271 番目のアミノ酸残基が Arg、297 番目のアミノ酸残基が Asp、313 番目のアミノ酸残基が Pro、又は 316 番目のアミノ酸残基が Val であるアミノ酸配列を有し；かつ請求項 4 のポリペプチドに対する抗体産生を誘導する免疫原性を有する、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 12】

該相同性が少なくとも 90% である、請求項 11 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

該相同性が少なくとも 95% である、請求項 11 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 14】

番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項15】

配列番号1のアミノ酸配列の部分配列；又は配列番号1のアミノ酸配列に対し、少なくとも80%の相同性を有し、かつ配列番号1のアミノ酸配列に対応して、少なくともN-末端から39、84、296又は300番目のアミノ酸残基がAla、85番目のアミノ酸残基がThr、163又は333番目のアミノ酸残基がSer、195又は257番目のアミノ酸残基がLeu、271番目のアミノ酸残基がArg、297番目のアミノ酸残基がAsp、313番目のアミノ酸残基がPro、又は316番目のアミノ酸残基がValであるアミノ酸配列の部分配列を有し；かつ請求項4のポリペプチドに対する抗体産生を誘導する免疫原性を有する、ポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチド。

【請求項16】

配列番号2の第436～第1413のヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項17】

請求項11、14、15、又は16のいずれか1項記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項18】

請求項17のベクターで形質転換された、宿主細胞。

【請求項19】

請求項1、又は4記載のポリペプチド、又は請求項5記載のポリペプチド断片を製造する方法であって、請求項18の宿主細胞を該ポリペプチド又は該ポリペプチド断片が産生され得る条件で培養し、次いで該ポリペプチド又は該ポリペプチド断片を回収することを含む、該製造方法。

【請求項20】

配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに対応する、少なくとも15ヌクレオチドを含む、PCR用プライマー。

【請求項21】

配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、相補的なポリヌクレオチドに対応する、少なくとも15ヌクレオチドを含む、PCR用プライマー。

【請求項22】

配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドの検出方法であって、請求項20及び21のPCR用プライマーを用い、PCRを行うことを含む、該検出方法。

【請求項23】

配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを検出するキットであって、請求項20及び21のPCR用プライマーを含む該キット。

【請求項24】

配列番号2の第436～第1413のヌクレオチド配列の部分配列に対応するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列において、少なくとも1塩基が付加、欠失、又は置換された変異ヌクレオチド配列からなり、ヒト肝臓ガンの特異的タンパク質の発現を抑制する、ヌクレオチド対が15～25のRNA分子。

【請求項25】

該ヌクレオチド対が18～24である、請求項24記載のRNA分子。

【請求項26】

該ヌクレオチド対が21～23である、請求項24記載のRNA分子。

【請求項27】

該特異的タンパク質が、配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質、又はその変異タンパク質である、請求項24記載のRNA分子。

【請求項28】

該変異タンパク質が、配列番号1のアミノ酸配列と80%の相同性を有するアミノ酸配列

するタンパク質である、請求項 24 記載の RNA 分子。

【請求項 29】

該変異タンパク質が、配列番号 1 のアミノ酸配列と 90% の相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である、請求項 24 記載の RNA 分子。

【請求項 30】

該変異タンパク質が、配列番号 1 のアミノ酸配列と 95% の相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である、請求項 24 記載の RNA 分子。

【請求項 31】

配列番号 10 のヌクレオチド配列からなる RNA 分子。

【請求項 32】

配列番号 10 の配列において、少なくとも 1 塩基が付加、欠失、又は置換された変異ヌクレオチド配列からなり、かつ、ヒト肝臓ガンの特異的タンパク質の発現を抑制する RNA 分子。

【請求項 33】

その 3'-末端に水酸基を有する、請求項 24 記載の該 RNA 分子。

【請求項 34】

請求項 24～33 のいずれか 1 項記載の RNA 分子を含む、ヒト肝臓ガンの特異的タンパク質の発現を抑制する医薬組成物。

【請求項 35】

ヒト肝臓ガンの特異的タンパク質、又はその変異タンパク質を発現する細胞に、請求項 24～32 のいずれか 1 項記載の RNA 分子を導入すること、該 RNA 分子により RNA 干渉が生じる条件下に前記細胞を維持し、該特異的タンパク質、又はその変異タンパク質をコードする遺伝子から転写された mRNA を分解させることを含む、ノックアウト細胞の製造方法。

【請求項 36】

請求項 34 記載の方法で製造した、ノックアウト細胞。

【請求項 37】

請求項 24～32 のいずれか 1 項記載の RNA 分子を含む、ヒト肝臓ガン特異的タンパク質の機能解析用キット。

【発明の名称】明細書

【発明の名称】肝臓ガン特異的ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び該ポリペプチドの発現を抑制するRNA分子

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な肝臓ガン特異的ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び該ポリペプチドの発現を抑制するRNA分子に関するものである。さらに詳細に述べると、ヒト原ガン遺伝子Pim-3にコードされている新規な肝臓ガン特異的ポリペプチド、その特異的な抗体、診断キット、該特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチド又は断片を含むベクター、形質転換体、及び該特異的ポリペプチドの発現を特異的に抑制し、肝臓ガンの治療に適用し得るRNA分子に関するものである。

【背景技術】

【0002】

肝臓ガンは、東南アジア、アフリカ、南ヨーロッパに多く見られるガンであって、ガンによる死因の第8位を占め、我国でも西日本を中心に発生率が高い。この肝臓ガンは、B型又はC型肝炎ウィルスの持続感染による慢性肝炎、肝硬変が主な原因と考えられている（非特許文献1）。

この肝臓ガンの診断方法として、 α -フェトプロテイン(AFP)やPIVKA-IIなどの腫瘍マーカーを利用した血液検査、レントゲン、超音波検査、CT、MRI、血管造影などの画像診断などが行われている。しかし、 α -フェトプロテイン(AFP)などの腫瘍マーカーは、慢性肝炎や肝硬変があれば肝臓ガンがなくとも比較的高値を示すため、再検査や、画像診断の併用と経過観察が必要であり、さらに、原発性肝臓ガンが発生していても検出されないケースもある。また、画像診断では、ヒトによっては見にくかったり、死角があったりするため、複数の検査を組み合わせないと見落としが起きるなどの問題がある。このため、肝臓ガンに関し、さらに精度が高く、効率的な検査方法が必要とされている。

【0003】

また、肝臓ガンの治療方法として、手術による肝臓ガンの切除、マイクロウェーブ凝固法(MCT)、ラジオ波凝固法(RFA)、エタノール注入療法(PEIT)、肝動脈塞栓術、リザーバーを用いた肝動脈内抗癌剤投与による化学療法、放射線療法などが行われている。しかし、肝臓ガンの患者は、慢性肝炎や肝硬変などの慢性肝疾患を合併しているため肝機能が悪く治療法が制約されることが多く、手術ができないだけでなく、肝臓にかかる負担が小さい低侵襲の治療方法しか選択できない場合も少なくない。このため、肝機能が悪くとも適用できる負担の小さい治療方法が必要とされている。

近年、分子生物学、遺伝子工学の著しい進歩に伴い、各種のガンにおいて新しい腫瘍マーカー、抗体、また低分子干渉性RNA(Small Interfering RNA: siRNA)が報告されており（特許文献1及び2）、肝臓ガンに関しても同様の研究により、優れた診断方法及び治療方法の開発が望まれている。

【特許文献1】国際公開第99/032619号パンフレット

【特許文献2】国際公開第01/075164号パンフレット

【非特許文献1】Geller, S. A. 2002. Hepatitis B and hepatitis C. Clin. Liver Dis. 6:317-334.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、肝臓ガンの新規な診断方法、診断薬、及び治療薬の開発につながる、新規な肝臓ガン特異的ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び該ポリペプチドの発現を抑制するRNA分子を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

肝臓ガンの原因と考えられている肝炎ウイルスの感染は、ウイルスの根絶と肝臓障害の両方に影響を与える、ウイルス抗原特異的な細胞溶解性Tリンパ球 (CTL) を発生させる。さらに、CTLが関与する肝臓細胞の破壊と再生の循環は、肝臓ガンへと導く分裂誘発性と突然変異誘発性の環境を作り出すと考えられている。この仮定は、骨髄を除去したHBV抗原 (HBs) トランスジェニックマウス (HBsTg) が、HBsで免疫した同系の野生型マウスから骨髄細胞と脾臓細胞の移植を受けて15ヶ月目に、肝臓ガンに罹患していたことを報告した、Nakamotoらの報告により示されている (*1)。しかし、この肝臓発症の基礎をなす分子機構は未だ完全には調べられていない。

【0006】

これまで、腫瘍の初期発生と悪性化は、様々な遺伝子の発現と構造の変化が蓄積された結果であることを示唆する証拠が相次いで報告されている。HBsTgの肝臓ガンモデルにおいても、症状の長期に渡る潜伏が、これと同じような複合的变化の存在を示唆している。遺伝子発現において、ゲノムの広範囲な変化を明らかにするために、肝臓ガンを含む様々なタイプの腫瘍でトランスクリプトーム解析が行われている。ほとんどの肝臓ガン研究において、遺伝子発現様式は、同一患者由来の肝臓の腫瘍部位と非腫瘍部位とで比較されてきた。しかし、正常組織に比べると、この非腫瘍部位においても複合的变化が予想されるため、このタイプの解析は、腫瘍部位と正常組織ではない非腫瘍部位に共通するのいくつかの遺伝子発現の変化を検出できていない可能性があった。移植後15ヶ月目において、HBsTgの肝臓内では、肝細胞の形成異常が確認できた非腫瘍部位と、腫瘍部位とが混在して存在していた。そのため、この非腫瘍部位を前癌状態の病変とし、正常組織と蛍光ディフュージョンディスプレイ (FDD) を用いて遺伝子発現様式の比較をした。

【0007】

すなわち、本発明者は、HBsTgの肝臓ガンモデルにおいて、前癌状態の病変で発現していた、いくつかの遺伝子を同定し、この中で、これまで肝臓における発現とヒトホモログが報告されていない原ガン遺伝子について研究を行った。その結果、Pim-3遺伝子がヒト肝臓ガン特異的なタンパク質をコードするという知見を得て、そのポリペプチドのアミノ酸配列、及びDNAのポリヌクレオチド配列を決定し、さらにその性質の研究を行い、本発明を完成したのである。

したがって、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチド、並びに配列番号1のアミノ酸配列に対し、少なくとも80%の相同性を有し；配列番号1のアミノ酸配列に対応して、少なくともN-末端から39、84、296又は300番目のアミノ酸残基がAla、85番目のアミノ酸残基がThr、163又は333番目のアミノ酸残基がSer、195又は257番目のアミノ酸残基がLeu、271番目のアミノ酸残基がArg、297番目のアミノ酸残基がAsp、313番目のアミノ酸残基がPro、又は316番目のアミノ酸残基がValであるアミノ酸配列を有し；かつ前記ポリペプチドに対する抗体産生を誘導する免疫原性を有するポリペプチドを提供する。

【0008】

さらに本発明は、配列番号1のアミノ酸配列の部分配列；又は配列番号1のアミノ酸配列に対し、少なくとも80%の相同性を有し、かつ配列番号1のアミノ酸配列に対応して、少なくともN-末端から39、84、296又は300番目のアミノ酸残基がAla、85番目のアミノ酸残基がThr、163又は333番目のアミノ酸残基がSer、195又は257番目のアミノ酸残基がLeu、271番目のアミノ酸残基がArg、297番目のアミノ酸残基がAsp、313番目のアミノ酸残基がPro、又は316番目のアミノ酸残基がValであるアミノ酸配列の部分配列を有し；かつ前記ポリペプチドに対する抗体産生を誘導する免疫原性を有する、ポリペプチド断片を提供する。

また、本発明は、前記ポリペプチド、又は前記ポリペプチド断片からなる群から選ばれた少なくとも1を含む、配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体の製造用組成物を提供する。

【0009】

また、本発明は、前記組成物を、哺乳類に投与することを含む、配列番号1のアミノ酸

を含むポリペプチドに特異的な抗体の製造方法を提供する。
また、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な抗体を含む、肝臓ガン、又は肝臓前ガン状態診断用キットを提供する。

さらに、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、さらに配列番号1のアミノ酸配列に対し、少なくとも80%の相同性を有し；配列番号1のアミノ酸配列に対応して、少なくともN-末端から39、84、296又は300番目のアミノ酸残基がAla、85番目のアミノ酸残基がThr、163又は333番目のアミノ酸残基がSer、195又は257番目のアミノ酸残基がLeu、271番目のアミノ酸残基がArg、297番目のアミノ酸残基がAsp、313番目のアミノ酸残基がPro、又は316番目のアミノ酸残基がValであるアミノ酸配列を有し；かつ前記ポリペプチドに対する抗体産生を誘導する免疫原性を有する、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0010】

また本発明は、配列番号1のアミノ酸配列の部分配列；又は配列番号1のアミノ酸配列に対し、少なくとも80%の相同性を有し、かつ配列番号1のアミノ酸配列に対応して、少なくともN-末端から39、84、296又は300番目のアミノ酸残基がAla、85番目のアミノ酸残基がThr、163又は333番目のアミノ酸残基がSer、195又は257番目のアミノ酸残基がLeu、271番目のアミノ酸残基がArg、297番目のアミノ酸残基がAsp、313番目のアミノ酸残基がPro、又は316番目のアミノ酸残基がValであるアミノ酸配列の部分配列を有し；かつ配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体産生を誘導する免疫原性を有する、ポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0011】

また本発明は、配列番号2の第436～第1413のヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドを提供する。

また、本発明は前記ポリヌクレオチドを含むベクター、及び該のベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

さらに本発明は、配列番号2の第436～第1413のヌクレオチド配列の部分配列に対応するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列において、少なくとも1塩基が付加、欠失、又は置換された変異ヌクレオチド配列からなり、ヒト肝臓ガンの特異的なタンパク質の発現を抑制する、ヌクレオチド対が15～25のRNA分子を提供する。

【0012】

また本発明は、配列番号3のヌクレオチド配列からなるRNA分子、又は配列番号3の配列において、少なくとも1塩基が付加、欠失、又は置換された変異ヌクレオチド配列からなり、かつ、ヒト肝臓ガンの特異的なタンパク質の発現を抑制するRNA分子を提供する。

また本発明は、前記RNA分子を含む、ヒト肝臓ガンの特異的なタンパク質の発現を抑制する医薬組成物を提供する。

また本発明は、ヒト肝臓ガンの特異的なタンパク質、又はその変異タンパク質を発現する細胞に、前記RNA分子を導入すること、該RNA分子によりRNA干渉が生じる条件下に前記細胞を維持し、該特異的なタンパク質、又はその変異タンパク質をコードする遺伝子から転写されたmRNAを分解させることを含む、ノックアウト細胞の製造方法を提供する。

また本発明は、前記RNA分子を含む、ヒト肝臓ガン特異的なタンパク質の機能解析用キットを提供する。

【発明の効果】

【0013】

本発明により、ヒト原ガン遺伝子Pim-3にコードされている新規な肝臓ガン特異的なポリペプチド、その特異的な抗体、該特異的なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び該特異的なポリペプチドの発現を特異的に抑制し、肝臓ガンの治療に適用し得るsiRNAが提供され、その結果、新規な肝臓ガンの診断方法、診断試薬、及び肝臓ガンの治療方法を開発することが可能になった。

明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明の肝臓ガン特異的ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、本発明のポリペプチドは、さらに該ポリペプチドと共通の抗原性を有するホモログ（ポリペプチド）、又はこれらと共通の抗原性を有するペプチド断片を含む。本発明のポリペプチドを検出することにより、肝臓ガンの診断を行うことができ、また、本発明のポリペプチド、そのホモログ、及び該ポリペプチド断片は、肝臓ガン診断用、及び治療用抗体の作製に有用である。本発明の特異的ポリペプチドの発見、及び単離の工程は、後述する実施例で詳細に説明されている。

【0015】

本明細書における「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸配列の一次構造、該一次構造のポリペプチド断片、立体構造を伴う生物活性を有するポリペプチド、又はタンパク質を意味する。

本明細書における「ホモログ」という用語は、特定のアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はタンパク質と、アミノ酸配列が相同性を有し、かつ共通の生物活性又は抗原性を有するポリペプチドをいう。

本発明における「siRNA」という用語は、特定の遺伝子の発現を抑制する短RNA断片、又は該RNA断片とその相補鎖からなる二本鎖RNA分子を意味する。

図3に示すように、本発明の肝臓ガン特異的ポリペプチドである、ヒトPim-3タンパク質は、ラット、及びマウスPim-3タンパク質と比較し、そのアミノ酸配列（配列番号：1）において、次の特徴的な相違点がある。すなわち、配列番号1のアミノ酸配列は、ラット、及びマウスと比較し、N-末端から39、84、296及び300番目のアミノ酸残基がAla、85番目のアミノ酸残基がThr、163及び333番目のアミノ酸残基がSer、195及び257番目のアミノ酸残基がLeu、271番目のアミノ酸残基がArg、297番目のアミノ酸残基がAsp、313番目のアミノ酸残基がPro、及び316番目のアミノ酸残基がValである点で相違するのである。

【0016】

したがって、本発明のポリペプチドホモログは、配列番号1のアミノ酸配列に対し、少なくとも80%の相同性を有し；配列番号1のアミノ酸配列に対応して、少なくともN-末端から39、84、296又は300番目のアミノ酸残基がAla、85番目のアミノ酸残基がThr、163又は333番目のアミノ酸残基がSer、195又は257番目のアミノ酸残基がLeu、271番目のアミノ酸残基がArg、297番目のアミノ酸残基がAsp、313番目のアミノ酸残基がPro、又は316番目のアミノ酸残基がValであるアミノ酸配列を有し；かつ配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体産生を誘導する免疫原性を有する、ポリペプチドである。なお、該ホモログの相同性は、特に90%、好ましくは95%、特に好ましくは97%である。

【0017】

また、本発明の特異的ポリペプチドのペプチド断片は、配列番号1のアミノ酸配列の部分配列；又は配列番号1のアミノ酸配列に対し、少なくとも80%の相同性を有し、かつ配列番号1のアミノ酸配列に対応して、少なくともN-末端から39、84、296又は300番目のアミノ酸残基がAla、85番目のアミノ酸残基がThr、163又は333番目のアミノ酸残基がSer、195又は257番目のアミノ酸残基がLeu、271番目のアミノ酸残基がArg、297番目のアミノ酸残基がAsp、313番目のアミノ酸残基がPro、又は316番目のアミノ酸残基がValであるアミノ酸配列の部分配列を有し；かつ配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対する抗体産生を誘導する免疫原性を有する、ポリペプチド断片である。

【0018】

本明細書において、ポリヌクレオチド、該ホモログ及び該ポリペプチドの断片（以下、必要な場合はポリヌクレオチド等と略す。）は、標準的表記法に従い、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。本発明のポリペプチド等は、C

がカルボキシル基 ($-\text{COOH}$)、カルボキシレート ($-\text{COO}^-$)、アミド ($-\text{CONH}_2$) 又はエステル ($-\text{COOR}$) とすることもできる。このエステルの側鎖 R の例を挙げると、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチルなどの C1-6 アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C3-8 シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどの C6-12 アリール基、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C1-2 アルキル基、又は α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C1-2 アルキル基などのアルキル基などがある。

また、本発明のポリペプチド等は、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が、ホルミル基、アセチル基などの保護基、生体内で切断されて生成する N末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基 (例えば $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など) が適当な保護基で保護されたもの、又は糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

【0019】

また、本発明のペプチド断片は、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する抗体産生を誘導するものであれば、特に限定されるものではないが、前記ポリペプチド、及びそのホモログ部分ペプチドであって、これらの 20 個～200 個、好ましくは 20 個～100 個、さらに好ましくは 20～70 個のアミノ酸配列を有するものである。

また、本発明のポリペプチド等は、生理学的に許容し得る無機又は有機酸付加塩として用いることができる。該無機酸付加塩の例を挙げると、塩酸、リン酸、臭化水素酸、及び硫酸の塩があり、また有機酸付加塩の例を挙げると、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、及びベンゼンスルホン酸などの塩がある。

【0020】

本発明の配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的な抗体の製造に用いる組成物は、前記ポリペプチド、そのホモログ、これらのペプチド断片、又はこれらの酸付加塩を含むものである。また、必要に応じて、該組成物はベヒクル、希釈剤、アジュバントなどの成分を含んでもよい。

本発明の抗体は、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそのペプチド断片に特異的に反応する抗体であり、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体のいずれであってもよい。

本発明のモノクローナル抗体は、次の方法で製造することができる。まず、前記抗体製造用組成物を非ヒト哺乳動物に投与する。抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 2～6 週毎に 1 回ずつ、計 2～10 回程度行う。該非ヒト哺乳動物の例を挙げると、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、及びニワトリがあり、一般に好ましいのはマウス、又はラットである。

【0021】

前記抗原で免疫した非ヒト哺乳動物から抗体産生が認められた個体を選択し、最終免疫の 2～5 日後に脾臓、又はリンパ節に含まれる抗体産生細胞採取し、同種、又は異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製する。抗血清中の抗体価の測定は、標識化タンパク質と抗血清とを反応させ、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行う。また細胞融合は、ケーラーとミルスタインの方法 (Nature,

256, 495, 1975) などの常法で行うことができる。融合促進剤として、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどを用いることができる。

また、骨髓腫細胞の例を挙げると、NS-1, P3U1, SP2/0, 及び AP-1 などの非ヒト哺乳動物の骨髓腫細胞があり、特に P3U1 が好ましい。融合に用いる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は 1:1～20 程度であり、PEG、好ましくは PEG 1000～PEG 6000 を 10～80% 度の濃度で添加し、20～40℃、好ましくは

37℃で1～10分間インキュベートすることにより細胞融合を実施できる。

【0022】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは、種々の方法で行うことができる。例えば、抗原を直接、又は担体とともに吸着させた固相（例えば、マイクロプレート）と、ハイブリドーマ培養上清を接触させ、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体を含む溶液を接触させ、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体などを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を接触させ、次いで放射性物質や酵素などで標識したタンパク質の溶液と接触させ、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがある。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選別は常法で行うことができる。例えば、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地に、10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））、又はハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は20～40℃、培養時間は、通常5日～3週間で、培養は、通常5%炭酸ガス存在下で行う。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0023】

また、得られたモノクローナル抗体の分離精製は、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、及び電気泳動法などの免疫グロブリンの分離精製法、イオン交換体（DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相、又はプロテインA活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法などの常法で行うことができる。

また、本発明のポリクローナル抗体は、免疫抗原である前記ポリペプチド等、又は該そのペプチド断片とキャリアータンパク質との複合体で、非ヒト哺乳動物を免疫し、その後、血清などの抗体含有成分を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。

【0024】

該免疫抗原とキャリアータンパク質との混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よく産生されるように決定する。例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合で用いることができる。また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等を用いることができる。

該複合体抗原は、単独で、又は担体、希釈剤、さらに抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントとともに投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回行う。該ポリクローナル抗体は、免疫された哺乳動物の血液、腹水、卵黄などから採取する。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。また、ポリクローナル抗体の分離精製は、前記モノクローナル抗体の分離精製と同様に行うことができる。

【0025】

本発明の肝臓ガン、又は肝臓前ガン状態診断用キットは、このようにして得られたポリクローナル、又はモノクローナル抗体を含む。また、該診断用キットは、必要に応じて、免疫反应用ウェル、染色剤、検出用の酵素標識抗体、洗浄液、抗体希釈液、検体希釈液、酵素基質、酵素基質液希釈液、その他の試薬を含むものである。

本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチド、該ポリペプチドと共通の抗原性を有するホモログ（ポリペプチド）、又はこれらと共通の抗原性を有するペプチド断片をコードする、ポリヌクレオチドである。特に、配列番号2の第436～第1413のヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドが好ましい。

【0026】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA、及びRNAのいずれであってもよい。該DNAは、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記肝臓ガン細胞又は組織由来のcDNA、合成DNAのいずれの形態であってもよい。また該ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、又はファージミドなどである。また、前記肝臓ガン細胞又は組織から調製した全RNA、又はmRNA画分を用いて直接、RT-PCR法によって増幅したものでよい。

また、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号2の第436～第1413のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドに抗原性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0027】

該ハイブリダイゼーションは、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 第2版 (J. Sambrook et al., Cold

Spring Harbor Lab. Press, 1989) などに記載された常法で行うことができる。また、該ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件をいう。

また、本発明のポリペプチドをコードするDNAは、本発明のポリペプチドをコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部、又は全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。該ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular

Cloning) 第2版 (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などで行うことができる。得られたDNAは、目的に応じて、そのまま、又は制限酵素で消化したり、リンカーを付加して使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを付加し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを付加してもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

【0028】

なお、ここで用いるプライマーには、配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドに対応する、又はそれに相補的なポリヌクレオチドに対応する、それに少なくとも15ヌクレオチドを含むPCR用プライマーがある。

また、これらのプライマーを用いて、配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを検出するキットを作製することができる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当なベクター中のプロモーターの下流に連結することで製造することができる。

ここで用いるベクターには、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルス、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neoなどがある。

【0029】

本発明で用いるプロモーターは、使用する宿主に対応した適切なプロモーターであればいかなるものでよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがある。該宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどがあり、該宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモ-

SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、該宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどがあり、さらに該宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどである。

【0030】

本発明の発現ベクターには、さらに所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジンなどを含むものを用いることができる。該選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子などがある。また、必要に応じて、宿主に適したシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN端末側に付加する。該宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoAシグナル配列、OmpAシグナル配列などが、該宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼシグナル配列、サブチリシンシグナル配列などが、該宿主が酵母である場合は、MF α シグナル配列、SUC2シグナル配列などが、該宿主が動物細胞である場合には、インシュリンシグナル配列、 α -インターフェロンシグナル配列、抗体分子シグナル配列などを利用できる。このように構築した本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0031】

本発明で用いる宿主には、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、及び動物細胞などがある。

該バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法がある。酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などの方法がある。昆虫細胞又は昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法がある。また、動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ウイルス学 (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法がある。このようにして、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を作製することができる。

【0032】

該宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含まれている。ここで炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープリカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液など、また無機栄養分としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどある。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0033】

エシェリヒア属菌を培養する培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。

また、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15

3℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

【0034】

宿主が酵母である形質転換体を培養する培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] がある。該培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する場合、グレイスインセクト培地 (Grace's Insect Medium: Grace,

T.C.C., Nature, 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を加えた培地などを用いる。該培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0035】

また、宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などを用いる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。このようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜又は細胞外に本発明のポリペプチドを産生させることができる。

【0036】

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、常法に従う。例えば、本発明のポリペプチドを培養菌体、細胞から抽出するに際して、培養後、公知の方法で菌体又は細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチーム及び／又は凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などである。該緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体又は細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、又は抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、公知の分離・精製法を適宜組み合わせで行う。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などがある。

【0037】

該ポリペプチドが遊離体で得られた場合には、公知の方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法により、遊離体または他の塩に変換することが

る。なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前又は精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどがある。このようにして生成した本発明のポリペプチドは、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより確認することができる。

さらに、本発明はヒト肝臓ガンの特異的タンパク質の発現を抑制するRNA分子を提供する。該RNA分子は、配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするmRNAを、その対応する配列で切断することにより発現を抑制するものと考えられている。例えば、ファイアの論文(Fire et.al., Nature 391, 806-811, (1998))に記載されているRNA干渉と同じ現象を起こすと考えられる。

【0038】

該RNA分子は、配列番号2の第436～第1413のヌクレオチド配列の部分配列に対応するヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列において、少なくとも1塩基が付加、欠失、又は置換された変異ヌクレオチド配列からなり、ヒト肝臓ガンの特異的タンパク質の発現を抑制する、RNA分子である。また、該RNA分子のヌクレオチド対の数は、15～25、好ましくは18～24、特に好ましくは21～23である。

前記該特異的タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はその変異ポリペプチドである。該変異ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列と80%の相同性、好ましくは90%の相同性、特に好ましいは95%の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0039】

また、本発明の該RNA分子は、配列番号3のヌクレオチド配列からなるRNA分子、又は配列番号3の配列において、少なくとも1塩基が付加、欠失、又は置換された変異ヌクレオチド配列からなり、かつ、ヒト肝臓ガンの特異的タンパク質の発現を抑制するRNA分子であってもよい。該RNA分子(siRNA)は、公知の方法(例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年)に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列をもとに設計することができる。

なお、本発明のRNA分子をIn vivo又はIn vitroで使用する場合、該RNA分子とその相補的RNAからなる2本鎖RNA分子とする。この場合、該二本鎖RNA分子が細胞内で分解しないよう、又は一本鎖に解離しないよう処理するのが好ましい。例えば、該RNA分子の3'-末端に水酸基付加する、二本鎖の両末端をチオホスホリル基によって化学結合させる、又各鎖の間に紫外線、ビス(2-クロロメチル)アミン、4-チオウラシル、ソラレンなどの二官能基により化学結合を誘導するなどの方法で処理することである。

【0040】

本発明のRNA分子は、ヒト肝臓ガンの特異的タンパク質の発現を抑制するものであるから、肝臓ガンの治療、及び前ガン状態細胞のガンへの移行を阻止する医薬組成物として使用することができる。

該RNA、又はその塩は、経口的に、又は非経口的に投与することができ、さらに該非経口的投与は、組織への局所的な投与を含む。

本発明の医薬組成物を経口投与する場合、汎用されている担体などの製剤用成分、例えば、充填剤、増量剤、結合剤、崩壊剤、崩壊抑制剤、緩衝剤、等張化剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、コーティング剤、界面活性剤、吸収促進剤、保湿剤、湿潤剤、吸着剤、滑沢剤及び賦形剤などを用いることができる。また、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤などの添加剤を用いてもよい。

【0041】

製薬用成分の具体的な例を挙げると、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸などの賦形剤、水、エタノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドンなどの結合

乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖などの崩壊剤、白糖、ステアリン酸、カカオバター、水素添加油などの崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩、ラウリル硫酸ナトリウムなどの吸収促進剤、グリセリン、デンプンなどの保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩等の滑沢剤などである。さらに必要に応じて、上記の各剤形について公知のドラッグデリバリーシステムの技術を採用し徐放化、局所適用化（トローチ、バツカル剤、舌下錠等）、薬物放出制御、腸溶性化、胃溶性化などを施すことができる。

【0042】

また、非経口投与する場合、点滴、静脈注射、皮下注射、筋肉注射などの注射による投与、油脂製坐剤、水溶性坐剤、座剤による直腸投与などの形態とすることができる。該調剤は、製薬分野における通常の担体を用い、常法により容易に行なうことができる。

本発明のsiRNAは、安全で低毒性なので、例えば、ヒト、その他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。該siRNA、又はその塩の投与量は、肝臓ガンの状況、投与対象、投与ルートなどにより差異はある。例えば、経口投与する場合、一般的に、体重60kgの成人患者においては、一日につき約10~4000mg、好ましくは約20~2000mg、より好ましくは約50~500mg投与する。非経口的に投与する場合は、該siRNAの1回投与量は投与対象、肝臓ガンの状況などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で体重60kgの成人患者においては、一日につき約10~2000mg程度、好ましくは約20~1000mg程度、より好ましくは約50~500mg程度を静脈から投与するのが好ましい。

【0043】

また、ヒト肝臓ガンの特異的タンパク質、又はその変異タンパク質を発現する細胞に、前記RNA分子を導入すること、該RNA分子によりRNA干渉が生じる条件下に前記細胞を維持し、該特異的タンパク質、又はその変異タンパク質をコードする遺伝子から転写されたmRNAを分解させることにより、Pim-3遺伝子のノックアウト細胞を製造することができる。このノックアウト細胞を使うことにより、Pim-3遺伝子がコードするポリペプチドの機能を調べることができる。したがって、前記RNA分子を利用することにより、Pim-3遺伝子ヒト肝臓ガン特異的タンパク質の機能解析用キットを作製することができる。

【産業上の利用可能性】

【0044】

本発明により提供されたヒト原ガン遺伝子Pim-3にコードされている新規な肝臓ガン特異的ポリペプチド、その特異的抗体、該特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び該特異的ポリペプチドの発現を特異的に抑制するsiRNAは、新規な肝臓ガンの診断方法、診断試薬、及び肝臓ガンの治療方法などの用途を有する。

【実施例1】

【0045】

肝臓ガンモデルマウスの作製

チサリ博士(Dr. F. V. Chisari: The Scripps Research Institute, La Jolla, CA)から、107-5D系統のHBsAgトランスジェニックマウス（公式名称；Tg[Alb-1,HBV]Bri66; inbred B10D2, H-2^d）の提供を受けた。107-5D系統には、アルブミンプロモーターの転写制御下に置かれたHBVエンベロープ全体をコードした領域（subtype ayw）が存在し、HBVのそれぞれスモール、ミドル、ラージエンベロープ蛋白質を肝細胞内で発現する（*2）。

【0046】

このマウスは、T細胞レベルでのHBs導入遺伝子に対し免疫寛容であるため（*3）、HBsAg特異的細胞障害性T細胞の養子移入を受けなければ、一生涯肝臓疾患の症状を見せることはない（*2、*4）。

慢性肝炎が関与する肝臓疾患モデルを下記の方法で作製した。すなわち、オスのHBsAgトランスジェニックマウスの胸腺を摘出し、放射線 (900 cGy) を照射した後、同系統の遺伝子操作をしていないB10D2 (H-2^d) マウスから骨髓細胞を移植しトランスジェニックマウスの造血システムを再構築した。そして骨髓移植後1週間目に、該マウスに、脾臓細胞の移植3週間前に、HBsAgを発現している組換えワクシニアウイルス (HBs-vac) を、腹膜内に感染させた同系統の遺伝子操作を行っていないB10D2 (H-2^d) マウスの脾臓細胞10⁸ 個を移植した。リンパ球の移植から12から15ヶ月後、複合的な肝臓ガンの病巣が該マウスに発生していた(*1)。

【0047】

非腫瘍部位と腫瘍部位とを実体顕微鏡下で区別し、別々に切り離した。そして、得られた非腫瘍部位を光学顕微鏡下で観察し、非ガン細胞で異常な形態をした肝細胞の存在を確かめた。そして、この非ガン細胞を含む非腫瘍部位を次の実験において前癌状態の病変として用いた。また、肝臓組織はコントロールとしてリン酸緩衝液で処理、または免疫していないマウス脾細胞を移植したトランスジェニックマウスからも得た。

【実施例2】

【0048】

肝臓ガン特異的タンパク質遺伝子のスクリーニング

実施例1のモデルマウス、及び正常マウス肝臓組織から抽出した全RNAを、イトウらにより記述されている方法に従い、蛍光ディファレンシャルディスプレイ (FDD) にかけた(*5)。

すなわち、全RNAをRNA-ビー (RNA-Bee: Biotecx Laboratories社) を用いて単離後、RNアーゼを含まないDNアーゼ (宝酒造株式会社) で処理した。精製されたRNA 2.5 µg、逆転写酵素 (SuperScript reverse transcriptase: Invitrogen社)、及び蛍光ラベルしたアンカープライマーGT15A, GT15C, GT15Gを用いて逆転写反応を行った。

【0049】

50 ngのRNAに相当するcDNAを合成し、該cDNAを、アンカープライマー0.5 µMと、任意のプライマー (10 mer kit A; Operon社) 0.5

µM、それぞれのdNTP50 µM、Gene Taq DNAポリメラーゼ (株式会社ニッポンジーン) 1ユニット、Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造株式会社) 1ユニットのとともに用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR生産物は、6%ポリアクリルアミド-8 M尿素ゲルで分離し、Vistra Fluor Imager SI (Molecular Dynamics社) で分析した。

そして、目的のバンドをゲルから抽出し、pSTBlue-1 ベクター (Novagen社) を用いてクローニングした。そして、挿入したcDNAの塩基配列を、CEQ 2000 DNA 分析システム (Beckman Coulter社) を用いて決定し、Gene Bankのデータベースと照らし合わせるため、BLASTプログラムで分析した。

【0050】

このようにして、本発明者らは、前癌状態の病変と正常肝臓との遺伝子発現様式を、60個の独立したプライマーの組み合わせを用いて、FDDで比較することができた。2回の独立した実験で、38個と56個のバンドの発現がそれぞれ再現性をもって上昇、または減少した。得られたバンドの塩基配列は、前癌状態の病変において発現が上昇、または減少したバンドで、それぞれ24個と19個の独立した遺伝子を確認することができた。これまでの研究報告では、これらのほとんどの遺伝子が肝臓において発現していることが示されている。

しかし、前癌状態の病変において発現が上昇したPim-3遺伝子に関して、正常肝細胞や肝臓ガン細胞における発現は報告されていなかったのも、本発明者らは該Pim-3、すなわちPim-1とPim-2を含むセリン/スレオニンキナーゼ活性を持つ原ガン遺伝子ファミリーに属するPim-3に焦点を当てて、半定量的RT-PCR解析を行った。

【実施例3】

【0051】

Pim-3の半定量的RT-PCR解析

実施例 2 の方法で抽出した全 RNA を用い、キタムラらの論文に記載された方法により半定量的 PCR 分析を実施した (*6)。Pim-3 遺伝子、及びグリセロアルデヒド 3 リン酸脱水酵素 (GAPDH) 遺伝子増幅用プライマーセットを用いて増幅を行い、対応する cDNA を得た。

これらのプライマーの配列を次に示す。

Pim-3 センス; 5'-AAGCAGTGACCTCTGACCCCTGGTGACC-3' (配列番号: 3)

Pim-3 アンチセンス; 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3' (配列番号: 4)

GAPDH センス; 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (配列番号: 5)

GAPDH アンチセンス; 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (配列番号: 6)

逆転写酵素 (REeverTra Ace: 東洋紡績株式会社)・ヘキサヌクレオチド・ランダム・プライマー (Amersham-Bioetch社) を含む 20 μ l の反応液中で、精製全 RNA 1 μ g から cDNA を合成した。得られた cDNA 0.5 μ l と TaqDNA ポリメラーゼ (宝酒造株式会社) 及び配列番号 3 と 4 ないし 5 と 6 の組み合わせのプライマーを用いて、Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem 社) にて、以下の温度条件で遺伝子増幅を行なった: (94 $^{\circ}$ C・2分) x (94 $^{\circ}$ C・30秒、55 $^{\circ}$ C・1分、72 $^{\circ}$ C・1分) x 30回、(72 $^{\circ}$ C・5分) x 1 回。

【0052】

得られた PCR 生産物を、1. 5% アガロースゲルにより分離し、臭化エチジウム染色で可視化した。バンドの強度を NIH イメージ分析ソフトウェア Ver 1.61 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて測定し、GAPDH との比率を計算した。

図 1 は、Pim-3 発現レベルを示すグラフである。図 1 において、N は、免疫した脾臓細胞を導入する前、9 は免疫した脾細胞を導入後 9 ヶ月目 (慢性肝炎の病変)、15 は免疫した脾細胞を導入後 15 ヶ月目 (前癌状態の病変)、及び C は免疫していない脾細胞を導入後 15 ヶ月目の HBsTg マウス肝臓組織から全 RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR 解析を行うことにより測定したデータを示す。Pim3 と GAPDH の PCR 生産物の比率を決定し、何も処理していないマウスの比率を 1.0 と仮定して比強度を計算した。そして、平均と SD を計算し、図に示した。統計学的有意性は ANOVA 検定を用いて評価し、 $P < 0.05$ は統計学的に有意とした。

この Pim-3 に焦点を当てた半定量的 RT-PCR 解析の結果は、前記 FDD 解析の結果と矛盾せず、図 1 から明かなように、Pim-3 mRNA の発現がコントロールと比べて前癌状態の組織で有意に強くなっていることを示している。

【実施例 4】

【0053】

ヒト Pim-3 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

実施例 2 及び 3 で、マウス肝癌モデルの前癌状態で特異的に発現する遺伝子と判断された Pim-3 (hPim-3) のヒト相同遺伝子のヌクレオチド配列を決定するため、ヒト肝臓ガン細胞株 HepG2 から cDNA ライブラリーを作製し、スクリーニングを行って Pim-3 cDNA のクローニングとヌクレオチド配列の決定を行った。

まず、細胞株 HepG2 を、熱で不活化したウシ胎児血清 (Atlanta Biologicals 社, Norcross, Ga.) 10% を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM; Sigma 社) を用いて、炭酸ガス 5% を含む空気で満たされた加湿環境において、37 $^{\circ}$ C で培養した。

【0054】

続いて、細胞株 HepG2 から全 RNA を単離し、ポリ A Tail を含む mRNA を、mRNA 精製キット (OligotexTM-dT30 mRNA Purification kit: 宝酒造株式会社) で分離した。得られた cDNA を、逆転写酵素 (SuperScript reverse

transcriptase: Invitrogen 社) とオリゴ-dT プライマーで合成し、使用説明書に従い、大腸菌 DH10B (Invitrogen 社) を用いて、pCMVSPORT6 (Invitrogen 社) 中に cDNA ライブラリーを構築した。1 段階目のスクリーニングは、配列番号 7 のオリゴマーをプローブとして

し、GENE
TRAPPER cDNAポジティブセレクションシステム (GENE TRAPPER cDNA Positive Selection System:
Invitrogen社) を利用して行った。

【0055】

オリゴマーの配列 5'-CTGTGAAGCACGTGGTGAAG-3' (配列番号: 7)
得られたコロニーに対し、前記プライマーセットを用いて2段階目のコロニーPCRスクリーニングを行った。

該2段階スクリーニングにより3個の陽性クローンが得られ、これらの3個の独立したcDNAクローンは、2,392bpのヌクレオチド配列からなる、同じインサートを含んでいた。5'非翻訳領域はGC含有率が82.3%であり、そして3'非翻訳領域はATTTAモチーフが5コピーとTAT Tモチーフが8コピー含まれていた (図2)。この配列は、ESTデータベース上で示されたh Pim-3

cDNA配列の特定部分配列と同一であった。そのオープンリーディングフレーム (ORF) は326残基のアミノ酸配列 (配列番号: 1を含む分子量35,875のポリペプチド (タンパク質) をコードしていた (図3)。なお、図2においてATリッチモチーフ (TATT又はATTTA) はハイライトで示した。

【0056】

さらに、該ORFから得られアミノ酸配列 (配列番号: 1) は、マウスやラットのPim-3ポリヌクレオチドと高度な同一性 (95.0%) を有していた (図3)。これらの結果をもとに、本発明者らは該クローンをヒトPim-3 cDNAと判断した。

該cDNAにコードされているヒトPim-3ポリペプチドは、ウズラPim (73.9%) やツメガエル (Xenopus) Pim-3 (Pim-1: 68.7%) とアミノ酸レベルで高い相同性を示した。さらに、該ヒトPim-3はヒトPim-1 (57.1%) 及びヒトPim-2 (44.0%) とアミノ酸レベルで高い相同性を示した (図4)。なお、図3におけるヒト、ラット、及びマウスPim-3の比較、並びに、図4のヒトPim1~3のアミノ酸配列の比較は、DNASIS-Mac バージョン3.0ソフトウェア (DNASIS-Mac version 3.0 software: Hitachi Software engineering Co., Ltd., Yokohama, Japan) を用いて行った。これらの配列においてhPim-3と同じアミノ酸残基はハイライトで示した。

【実施例5】

【0057】

ヒト正常組織におけるヒトPim-3 mRNAの発現

ヒト正常組織におけるhPim-3 mRNA の発現を調べるため、実施例3のhPim-3陽性cDNAクローン (2,392bp) に対応する2.4k bpのmRNAの発現をノーザンブロット解析により調べた。対象にした組織は、1: 脳、2: 心臓、3: 骨格筋、4: 結腸、5: 胸腺、6: 脾臓、7: 腎臓、8: 肝臓、9: 小腸、10: 胎盤、11: 肺、及び12: 末梢血の白血球 (数字は図5におけるレーン参照番号) であり、mRNAの量を評価するために、同じ組織におけるGAPDH mRNAの発現を解析し、それぞれのhPim-3のレーンに並行して示した。

【0058】

該ノーザンブロット解析におけるmRNA の分析は、ヒト12-レーン MTNTM ブロット (Human 12-Lane MTNTM Blot: Clontech社, Palo Alto, CA) を用いておこなった。In vitroで転写し、ジゴキシゲニン (DIG) でラベルしたプローブをそれぞれ適切な温度 (Pim-3; 70℃, GAPDH; 68℃) でハイブリダイズさせた。その後、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む2×SSCバッファーを用い68℃で15分間洗浄し、次いで0.1%SDSを含む0.5×SSCバッファーを用い68℃で15分間洗浄を行った。そして、ハイブリダイズしたプローブを使用説明書に従い、DIG検出キット (DIG

etection kit: Boehringer Mannheim Biochemicals社) で検出した。
その結果、図 5 示すようにPim-3は心臓と骨格筋で強く、脳、脾臓、腎臓、胎盤、肺、及び末梢血の白血球で中程度に発現していたのに対し、結腸や胸腺、肝臓、及び小腸では発現は検出されなかった。

【実施例 6】

【0059】

ヒト肝臓ガン細胞株におけるヒトPim-3 mRNAの発現

ヒト肝臓ガン細胞におけるhPim-3 mRNA の発現を調べるため、RT-PCR解析を行った。すなわち、ヒト肝臓ガン細胞株HepG2(1), Hep3B(2), HLE(3), HLF(4), HuH7(5), 及びSK-Hep(6)から、実施例 2 の方法で全RNAを抽出し、Pim-3遺伝子、及びグリセロアルデヒド 3 リン酸脱水酵素 (GAPDH) 遺伝子増幅用プライマーセットを用いてRT-PCRを行った。その結果、図 6 に示されているように、解析した肝臓ガン細胞すべてにhPim-3が検出された。なお、上記(1)～(6)は図 6 における参照番号である。

【実施例 7】

【0060】

Pim-3ポリペプチドに対する抗体の作製

抗Pim-3抗体を、アサヒテクノグラス株式会社に受託し、調製した。まず、Pim-3のポリペプチドのアミノ酸配列 (配列番号 1) のアミノ酸残基13位から32位に対応するペプチド断片を、カサガイのヘモシアニン (KLH) に結合させた化合物 (KLH: CGPGGVVDHLPVKILQPAKAD:配列番号: 8) を作製し、これを 2 羽のニワトリに投与して免疫した。免疫前と免疫後に卵黄を取得し、IgY蛋白質を使用説明書に従いEGGストラクトIgY精製システム (EGGstract IgY Purification System (Promega社) を用いて精製し、280 nmで吸光度を測定することにより定量した。

【実施例 8】

【0061】

ヒト肝臓ガン組織におけるhPim-3の発現

ヒト肝臓ガン組織におけるhPim-3の発現を調べるため、ヒト肝臓ガン組織と正常肝臓において抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った。

まず、パラフィンで包埋したヒト肝臓ガン領域組織をキシレン中で脱パラフィンを行い、エタノール濃度 (100～70%) の緩やかな勾配で処理し再水和した。該試料を0.3% (w/v) 過酸化水素を含むPBS(-)中で処理した後、3%の正常なウサギの血清 (DAKO) を含む2%のBSA/PBS(-)溶液に加え、アビジン-ビオチンブロッッキングキット (Avidin-Biotin blocking kit: Vector Laboratrise社) で処理した。続いて、該試料を載せたスライドを10 μ g/mlの抗Pim-3 IgY、又は免疫前に得たIgYにより一晩4℃で処理し、引き続き2.5 μ g/mlのビオチン結合ラビット-抗ニワトリIgY抗体 (Promega社) を用いて、室温で30分間処理した。得られた免疫複合体を、ベクタステインエリートABCキット (Vectastain Elite ABC kit: Vector Laboratories社) とベクタステインDAB基質キット (Vectastain DAB B substrate kit: Vector Laboratories社) を用いて、使用説明書に従い可視化した。その後、前記スライドを、ヘマトキシリン (hematixylin: DAKO社) で共染色し、顕微鏡下で観察した。また、コントロールとして、正常な肝臓組織を用い同様の処理を行って比較試料を作製した。

【0062】

その結果、図 7 に示すように肝臓ガン組織において、免疫前IgYではhPim-3ポリペプチドは検出されなかったが (図なし)、抗Pim-3抗体では、再生している胆管上皮と同じように (図なし)、多くの肝臓ガン細胞で免疫反応活性が検出された。一方、正常細胞ではhPim-3ポリペプチドは検出されなかった (図なし)。これらの結果から、正常肝臓胞ではPim-3が発現しておらず、一方、肝臓ガン細胞では特異的に発現していることが示されて

なお、図7のBは、Aの四角内領域の1つを拡大したものであり、Bは特異的に染色された肝臓ガン細胞を示している。拡大倍率はAが40倍、Bが400倍である。

【実施例9】

【0063】

siRNA の作製

まず、肝臓ガン特異的にhPim-3が発現するという知見に基づき、次の手順でsiRNA (Short interfering RNA) を作製した。その合成は、サイレンサー™ siRNA 合成キット (Silencer™ siRNA Construction Kit: Ambion社) を用いて、使用説明書に従って行った。まず、siRNA

標的ファインダー (siRNA Target Finder: Ambion社) 及び siRNA 設計ツール (siRNA Design Tool: Ambion社) を使用し、mRNA

における標的が、Pim-3をコードしているmRNAのオープンリーディングフレーム (ORF) にあるAA(N19)UU配列となるよう、siRNA二本鎖分子を設計した。すなわち選択したsiRNAの標的配列は、配列番号9のヌクレオチド配列を持つRNA部分である。該RNA部分に関し、他のヒトゲノム配列とともにBLAST検索にかけて標的の特異性を確認した。標的となるmRNA

のヌクレオチド配列と、作製したsiRNA のヌクレオチド配列は次のとおりである。

【0064】

標的となるmRNA のヌクレオチド配列 (cDNA対応) :

5'-GCACGTGGTGAAGGAGCGCGG-3' (配列番号: 9)

siRNA のヌクレオチド配列: 5'-CCGCGCUCCUUCACCACGUGC-3' (配列番号: 10)

次いで、陰性コントロールとして、B-ブリッジインターナショナル社で設計されたランダムRNA断片 (配列番号: 11) を採用した。

【0065】

ランダムRNA断片 のヌクレオチド配列 5'-GCGCGCUUUGUAGGAUUCG-3' (配列番号: 11)

【実施例10】

【0066】

hPim-3 siRNA の効果試験

実施例9のsiRNA 及びランダムRNA断片を用いてsiRNA の効果を試験した。

まず、HuH7細胞 (7×10^5 個) を直径6cm細胞培養ディッシュに播き、2日間培養したのち、前記siRNA 二本鎖分子、及びランダムRNA断片をそれぞれ125 pmolと、リポフェクタミン 2000 (Lipofectamine 2000: Invitrogen社) 12.5 μ l、及び Opti-MEM (Invitrogen社) 2.5

mlを混ぜ、室温20分間静置した。該混合液は、事前に無血清DMEMで洗浄した飽和前の細胞に直接加えた。次の日、FBSを20%含むDMEMを2.5 ml加え、FBSの最終濃度が10%になるように調整した。所定の時間静置した後、次の解析のために細胞を回収した。

【0067】

このようにトランスフェクションしてから2日後、細胞をトリプシンで処理し96-ウェルプレートにそれぞれ 5×10^3 個の細胞を播いた。細胞の生存活性はWST-1

試薬 (MTTのアナログ; Boehringer Mannheim Biochemicals社) を使用して、毎日測定し、0日目の値を基準として比率を計算することにより細胞増殖解析を行った。

該解析の結果、図8のグラフで示すように、ランダムRNA断片をトランスフェクションさせたコントロールと比較し、Pim-3のsiRNA をトランスフェクションした場合、明らかに細胞の生存活性は減少していた。また、トランスフェクション後4日目以降では、図9に示すように、ランダムRNA断片処理群は細胞が剥がれていないのに対し、Pim-3のsiRNA の処理群では細胞が剥がれ始めた。したがって、Pim-3のsiRNA 処理によりヒト肝臓ガン細胞HuH7の生存活性が低下することが示されている。

【実施例11】

【0068】

hPim-3 siRNA を導入した肝臓ガン細胞の細胞周期の解析
 実施例 10 と同じ方法で hPim-3 siRNA を導入した肝臓ガン細胞 HuH7 を用い、フローサイトメトリーによる細胞周期解析を行った。すなわち、該細胞をトランスフェクション後 4 日目に回収し、氷中でエタノールを用いて細胞を固定した。そして、ヨウ化プロピジウム (propidium iodide) 50 $\mu\text{g/ml}$ と、RNアーゼ A1 $\mu\text{g/ml}$ を加え、室温で 30 分間処理し、EDTA を最終濃度 10 μM となるように加えて反応を止めた。細胞をフィルター処理した後、FACS キャリバー (FACSCaliber: Becton Dickinson 社, Bedford, Mass.) を用いて分析し、次いで、それぞれの細胞周期の分布を細胞探索分析ソフトウェア (Cell Quest analysis software: Becton Dickinson 社) を用いて検討した。その結果、図 10 に示すように、Pim-3 の siRNA を導入した肝臓ガン細胞では、ランダム mRNA 断片を導入した細胞や、コントロールの細胞と比較し、G1 期や G2/M 期の細胞が減少し、サブ-G1 期の細胞が高い比率で含まれていた。実施例 10 で示されたガン細胞 HuH7 の生存活性の低下、及び細胞周期の変化は、hPim-3 siRNA により、hPim-3 の発現が抑制され細胞 HuH7 の細胞死が誘導されたこと示している。

【0069】

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

- (配列番号: 1) 本発明の肝臓ガン特異的ポリペプチドに含まれる、アミノ酸配列の示す。
- (配列番号: 2) 本発明の肝臓ガン特異的ポリペプチド、及びその調整領域等をコードする塩基配列を示す。
- (配列番号: 3) 実施例 3 で用いた Pim-3 センスプライマーの塩基配列を示す。
- (配列番号: 4) 実施例 3 で用いた Pim-3 アンチセンスプライマーの塩基配列を示す。
- (配列番号: 5) 実施例 3 で用いた GAPDH センスプライマーの塩基配列を示す。
- (配列番号: 6) 実施例 3 で用いた GAPDH アンチセンスプライマーの塩基配列を示す。
- (配列番号: 7) 実施例 4 で hPim-3 の一次スクリーニングに用いたプローブの塩基配列を示す。hosi
- (配列番号: 8) 実施例 7 で用いられた hPim-3 ポリペプチドに対する抗体製造に用いたエピトープのアミノ酸配列を示す。

【0070】

(配列番号: 9) 実施例 9 における標的となる mRNA のヌクレオチド配列 (cDNA 対応) を示す。

(配列番号: 10) 実施例 9 で作製した本発明の siRNA のヌクレオチド配列を示す。

(配列番号: 11) 実施例 9 で用いたランダム RNA 断片のヌクレオチド配列を示す。

【0071】

(参考文献)

1. Nakamoto, Y., L. G. Guidotti, C. V. Kuhlen, P. Fowler, and F. V. Chisari. 1998. Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Med.* 188:341-350.
2. Chisari, F. V., P. Fillipi, A. McLachlan, D. R. Milich, M. Riggs, S. Lee, R. D. Palmiter, C. A. Pinkert, and R. L. Brinster. 1986. Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. *J. Virol.* 60:880-887.
3. Wirth, S., L. G. Guidotti, K. Ando, H. J. Schlicht, and F. V. Chisari. 1995. Breaking tolerance leads to autoantibody production but not autoimmune liver disease in hepatitis B virus envelope transgenic mice. *J. Immunol.* 154:2504-2515.

【0072】

- Akiyama, T., S. Guilhot, K. Klopchin, B. Moss, C. A. Pinkert, R. D. Parmiter, R. L. Brinster, O. Kanagawa, and F. V. Chisari. 1990. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science* 248:361-364.
5. Ito, T., and Y. Sakaki. 1999. Fluorescent differential display: a fast and reliable method for message display polymerase chain reaction. *Methods enzymol.* 303:298-309.
6. Kitamura, K., Y. Nakamoto, M. Akiyama, C. Fujii, T. Kondo, K. Kobayashi, S. Kaneko, and N. Mukaida. 2002. Pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55-mediated signals in dimethylnitrosamine-induced murine liver fibrosis. *Lab. Invest.* 82:571-583.

【図面の簡単な説明】

【0073】

- 【図1】 HBS-TgマウスにおけるPim-3発現レベルを示すグラフである。
- 【図2】 hPim-3のポリヌクレオチド配列、及び対応するポリペプチド配列を示す。
- 【図3】 ヒト、マウス及びラットのPim-3のアミノ酸配列を比較した図である。
- 【図4】 ヒトPim-1、Pim-2及びPim-3のアミノ酸配列を比較した図である。
- 【図5】 ヒト正常組織におけるhPim-3とGAPDHの mRNAの発現を示す図である。
- 【図6】 ヒト肝臓ガン細胞株におけるヒトPim-3 mRNAの発現を示す図である。
- 【図7】 ヒト肝ガン組織におけるhPim-3の発現を特異的に示す図である。
- 【図8】 hPim-3のsiRNA をトランスフェクションした場合における、ヒト肝臓ガン細胞の生存活性の減少を示すグラフである。
- 【図9】 hPim-3のsiRNA トランスフェクション4日目以降に、その処理群で細胞が剥がれ始めたことを示す図である。
- 【図10】 Pim-3のsiRNA を導入したヒト肝臓ガン細胞における細胞周期の変化を示すグラフである。

表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kureha Chemical Industry Company Limited

MUKAIDA, Naofumi

FUJII, Chifumi

<120> Polypeptide associated with hepatocellular carcinoma, polynucleotide encoding the polypeptide and RNA molecule suppressing the polypeptide expression

<130> 0701011001

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Leu	Leu	Ser	Lys	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	His	Leu	Cys	Gly	Pro	Gly
1				5					10					15	

Gly	Val	Asp	His	Leu	Pro	Val	Lys	Ile	Leu	Gln	Pro	Ala	Lys	Ala	Asp
			20					25					30		

L Ser Phe Glu Lys Ala Tyr Gln Val Gly Ala Val Leu Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Phe Gly Thr Val Tyr Ala Gly Ser Arg Ile Ala Asp Gly Leu
50 55 60

Pro Val Ala Val Lys His Val Val Lys Glu Arg Val Thr Glu Trp Gly
65 70 75 80

Ser Leu Gly Gly Ala Thr Val Pro Leu Glu Val Val Leu Leu Arg Lys
85 90 95

Val Gly Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp
100 105 110

Phe Glu Arg Pro Asp Gly Phe Leu Leu Val Leu Glu Arg Pro Glu Pro
115 120 125

Ala Gln Asp Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Asp Glu
130 135 140

Pro Leu Ala Arg Arg Phe Phe Ala Gln Val Leu Ala Ala Val Arg His
145 150 155 160

Cys His Ser Cys Gly Val Val His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Leu
165 170 175

Leu Val Asp Leu Arg Ser Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg
195 200 205

Val Tyr Ser Pro Pro Glu Trp Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg
210 215 220

Ser Ala Thr Val Trp Ser Leu Gly Val Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys
225 230 235 240

Gly Asp Ile Pro Phe Glu Gln Asp Glu Glu Ile Leu Arg Gly Arg Leu
245 250 255

Leu Phe Arg Arg Arg Val Ser Pro Glu Cys Gln Gln Leu Ile Arg Trp
260 265 270

Cys Leu Ser Leu Arg Pro Ser Glu Arg Pro Ser Leu Asp Gln Ile Ala
275 280 285

Ala His Pro Trp Met Leu Gly Ala Asp Gly Gly Ala Pro Glu Ser Cys
290 295 300

Asp Leu Arg Leu Cys Thr Leu Asp Pro Asp Asp Val Ala Ser Thr Thr
305 310 315 320

Ser Ser Ser Glu Ser Leu
325

<210> 2

<211> 2392

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2
agcggaccga cgcgacacgc cgtgcgcctc cgcggtctgcg ctacgaaaac gagtcccggga 60
gcggccccgc gcccgccgca cccggccctc gccaccccga agacaggcgc ccagctgccc 120
cgccgtctcc ccagctagcg cccggccgccc gccgcctcgc gggccccggg cggaaggggg 180
cggggtcccg attcgccccg ccccgcgga gggatacgcg gcgccgcggc ccaaaacccc 240
cgggcgaggc ggccggggcg ggtgaggcgc tccgcctgct gctcgtctac gcggtccccg 300
cgggccttcc gggcccaactg cgccgcgcgg accgcctcgg gctcggacgg ccggtgtccc 360
cggcgcgccg ctcgcccga tcggccgcgg cttcggcgcc tggggctcgg ggctccgggg 420

aggccgtcgc ccgcgatgct gctctccaag ttcggctccc tggcgcacct ctgcgggccc 480
ggcggcgtgg accacctccc ggtgaagatc ctgcagccag ccaaggcgga caaggagagc 540
ttcgagaagg cgtaccaggt gggcgccgtg ctgggtagcg gcggcttcgg cacggtctac 600
gcgggtagcc gcatcgccga cgggctcccg gtggctgtga agcacgtggt gaaggagcgg 660
gtgaccgagt ggggcagcct gggcggcgcg accgtgcccc tggaggtggt gctgctgcgc 720
aaggtgggcg cggcgggagg cgcgcgcggc gtcacccg ccgagccgg cgaggacct cttcgacttt 780
cccgacggct tcctgctggt gctggagcgg cccgagccgg cgaggacct cttcgacttt 840
atcacggagc gcggcgccct ggacgagccg ctggcgcgcc gcttcttcgc gcagggtgctg 900
gccgccgtgc gccactgcca cagctgcggg gtcgtgcacc gcgacattaa ggacgaaaat 960
ctgcttgttg acctgcgctc cggagagctc aagctcatcg acttcggttc ggggtgcgctg 1020
ctcaaggaca cgggtctacac cgacttcgac ggcacccgag tgtacagccc cccggagtgg 1080
atccgctacc accgctacca cgggcgctcg gccaccgtgt ggtcgctggg cgtgcttctc 1140
tacgatattg tgtgtgggga catccccttc gagcaggacg aggagatcct ccgaggccgc 1200
ctgctcttcc ggaggagggt ctctccagag tgccagcagc tgatccggtg gtgcctgtcc 1260
ctgcggccct cagagcggcc gtcgctggat cagattgcgg cccatccctg gatgctgggg 1320
gctgacgggg gcgccccgga gagctgtgac ctgcggctgt gcaccctcga ccctgatgac 1380
gtggccagca ccacgtccag cagcgagagc ttgtgaggag ctgcacctga ctgggagcta 1440
ggggaccacc tgccttggcc agacctggga cgccccaga ccctgacttt ttctgctg 1500
ggcgtctcc tcctgcggaa gcagtgcct ctgaccctg gtgaccttcg ctttgagtgc 1560
cttttgaacg ctggtccgc gggacttgggt tttctcaagc tctgtctgtc caaagacgct 1620
ccggtcgagg tccgcctgc cctgggtgga tacttgaacc ccagacgccc ctctgtgctg 1680
ctgtgtccgg aggcggcctt cccatctgcc tgcccaccg gagctcttcc cgccggcgca 1740
gggtcccaag cccacctccc gccctcagtc ctgcggtgtg cgtctgggca cgtcctgcac 1800
acacaatgca agtcttgcc tccgcgccc cccgcccacg cgagccgtac ccgcccga 1860
ctctgttatt tatggtgtga cccctggag gtgccctcgg cccaccgggg ctatttattg 1920

tttaatttat ttgttgaggt tatttcctct gagcagtctg cctctcccaa gccccagggg 1980
acagtgggga ggcaggggag ggggtggctg tgggccaggg accccaggcc ctgattcctg 2040
tgcctggcgt ctgtcctggc cccgcctgtc agaagatgaa catgtatagt ggctaactta 2100
aggggagtgg gtgaccctga cacttccagg cactgtgccc agggtttggg ttttaaatta 2160
ttgactttgt acagtctgct tgtgggctct gaaagctggg gtggggccag agcctgagcg 2220
tttaatttat tcagtacctg tgtttgtgtg aatgcggtgt gtgcaggcat cgcagatggg 2280
ggttctttca gttcaaaagt gagatgtctg gagatcatat tttttatac aggtatttca 2340
attaaaatgt ttttgtacat aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2392

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 3

aagcagtgac ctctgacccc tgggtgacc

28

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 4

cagcgaacc gctcattgcc aatgg

25

<210> 5

<211> 20

 DNA

<213> Artificial

<400> 5
accacagtcc atgcatcac

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 6
tccaccaccc tgttgctgta

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 7
ctgtgaagca cgtggtgaag

20

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 8

1 C y Pro Gly Gly Val Asp His Leu Pro Val Lys Ile Leu Gln Pro
5 10 15

Ala Lys Ala

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 9

gcacgtggtg aaggagcgcg g

21

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<400> 10

ccgcgcuccu ucaccacgug c

21

<210> 11

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<400> 11

gcgcgcuuug uaggauucg

19

類名】 図面

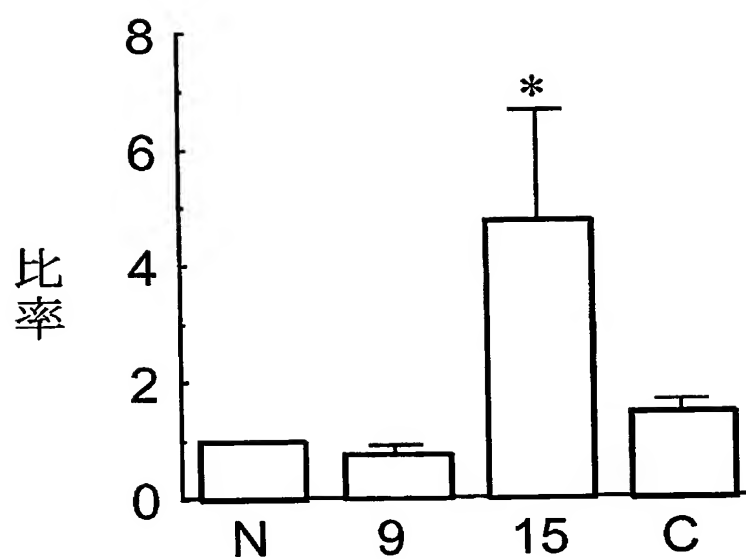


図 1

[illegible]

31

		10	20	30	40	50	
ヒト	1	MLLSKFGSLA	HLCCPGGVVDH	LPVKILOPAK	ADKESFEKAY	QVGAVLGSGG	50
ラット	1	MLLSKFGSLA	HLCCPGGVVDH	LPVKILOPAK	ADKESFEKVY	QVGAVLGSGG	50
マウス	1	MLLSKFGSLA	HLCCPGGVVDH	LPVKILOPAK	ADKESFEKVY	QVGAVLGSGG	50
		60	70	80	90	100	
ヒト	51	FGTVYAGSRI	ADGLPVAVKH	VVKERVTEWG	SLGGATVPLE	VVLLRKVGAA	100
ラット	51	FGTVYAGSRI	ADGLPVAVKH	VVKERVTEWG	SLGGMAVPLE	VVLLRKVGAA	100
マウス	51	FGTVYAGSRI	ADGLPVAVKH	VVKERVTEWG	SLGGVAVPLB	VVLLRKVGAA	100
		110	120	130	140	150	
ヒト	101	GGARGVIRLL	DWFERPDGFL	LVLERPEPAQ	DLFDFTTERG	ALDEPLARRF	150
ラット	101	GGARGVIRLL	DWFERPDGFL	LVLERPEPAQ	DLFDFTTERG	ALDEPLARRF	150
マウス	101	GGARGVIRLL	DWFERPDGFL	LVLERPEPAQ	DLFDFTTERG	ALDEPLARRF	150
		160	170	180	190	200	
ヒト	151	FAQVLAAYRH	CHSCGVVHRD	IKDENLLVDL	RSGLKLIDF	GSGAVLKDTV	200
ラット	151	FAQVLAAYRH	CHSCGVVHRD	IKDENLLVDL	RSGLKLIDF	GSGAVLKDTV	200
マウス	151	FAQVLAAYRH	CHSCGVVHRD	IKDENLLVDL	RSGLKLIDF	GSGAVLKDTV	200
		210	220	230	240	250	
ヒト	201	YTDFDGTRYV	SPPEWIRYHR	YHGRSATVWS	LGVLLYDMVC	GDIPFEQDEE	250
ラット	201	YTDFDGTRYV	SPPEWIRYHR	YHGRSATVWS	LGVLLYDMVC	GDIPFEQDEE	250
マウス	201	YTDFDGTRYV	SPPEWIRYHR	YHGRSATVWS	LGVLLYDMVC	GDIPFEQDEE	250
		260	270	280	290	300	
ヒト	251	ILRGRLFFRR	RVSPECQOLI	RWCLSLRPSE	RPSLDQIAAH	PWMTGADGGA	300
ラット	251	ILRGRLFFRR	RVSPECQOLI	RWCLSLRPSE	RPSLDQIAAH	PWMLGTEGSV	300
マウス	251	ILRGRLFFRR	RVSPECQOLI	RWCLSLRPSE	RPSLDQIAAH	PWMLQTEGSV	300
		310	320				
ヒト	301	PESCRLRLCT	LDPDDVASTT	SSSESL			
ラット	301	PENCRLRLCA	LDTDDGASTT	SSSESL			
マウス	301	PENCRLRLCA	LDTDDGASTT	SSSESL			

図 3

4]

		10	20	30	40	50	
Pim-1	1	MLLSKINSLA	HL-RAAPCND	LHATKILAPGK	EKEPLESQV	QVGPLEGSGG	50
Pim-2	1	MLTKPLQ---	---GPPAP	PGTPTPPGG	KDRHAFBAEY	RLGPLLGKGG	50
Pim-3	1	MLLSKFGSLA	HLCGPGGVVDH	LPVKILQPAK	ADKHSFEKAY	QVQAVLGSGG	50
		60	70	80	90	100	
Pim-1	51	FGSVYSGIRV	SDNLPVAKH	VERDRISDWG	ELPNQTRVPM	EVVLLKKVSS	100
Pim-2	51	FGTVFAGHRL	TDRLQVAIKV	IPNRKVLGWS	PLSDSVTCPL	EVALLWKVGA	100
Pim-3	51	FGTVYAGSRI	ADGEPVAVKE	VVKERKTEHWG	SLGGATVPL	EVVLLREVGA	100
		110	120	130	140	150	
Pim-1	101	---GSGVIRL	LDWFERPESE	VLILERPEPV	QDLFDITER	GALQEEIARS	150
Pim-2	101	CGCHPGVIRL	LDWFERPESE	MLVLERPEPA	QDLFDITER	GPIGEGPSRC	150
Pim-3	101	AGGARGVIRL	LDWFERPDGE	LLVLERPEPA	QDLFDITER	GALDEPLARR	150
		160	170	180	190	200	
Pim-1	151	FFWQVLEAVS	HCHNCGVLHR	DIKDENILID	LNRGELKLID	FGSGALLKDT	200
Pim-2	151	FFGQVVAATQ	HCHSRGVVHR	DIKDENILID	LRRGCAKLID	FGSGALLHDE	200
Pim-3	151	FFAQVLAAYR	HCHSCGVVHR	DIKDENILVD	LRSSELKLID	FGSGALLKDT	200
		210	220	230	240	250	
Pim-1	201	YYTDFDGTTRV	YSPPEWIRYH	RYHGRSAAVW	SLGILLYDMV	CGDIPFEHDE	250
Pim-2	201	YTDFDGTTRV	YSPPEWISRH	OYHALPATVW	SLGILLYDMV	CGDIPFERDQ	250
Pim-3	201	YYTDFDGTTRV	YSPPEWIRYH	RYHGRSATVW	SLGVLLYDMV	CGDIPFEQDE	250
		260	270	280	290	300	
Pim-1	251	EHRGQVFFR	QRVSSECQHL	IRWCLALRPS	DRPTFEEIQN	HPWMQDVLL	300
Pim-2	251	EILEAEIHR	AHVSPDCAL	IRRCIAPKPS	SRPSLEIRLL	DPWMQTPAED	300
Pim-3	251	EILRGRLLFR	RRVSPCCQL	IRWCLSLRPS	FRPSLDQIAA	HPWMLGADGG	300
		310	320	330	340		
Pim-1	301	P---QET	AEIHL---	---HSLSPG	P---	SK	
Pim-2	301	VTPQPLQRRP	CPFGELVLA TL	SLAWPGIAPN	GQKSHPMAMS	QG	
Pim-3	301	A---PES	CDLRL---	---CTLDPD	DVASTTSSE	SL	

図 4

5]

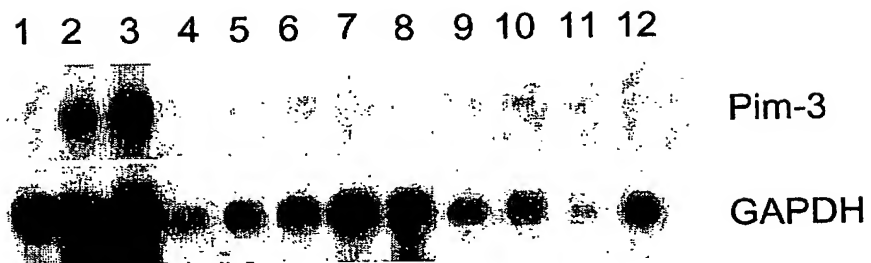


図 5

6]

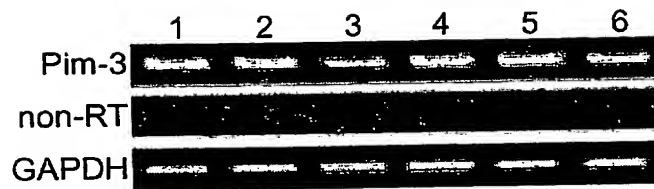


図 6

71

A



B



図 7

8]

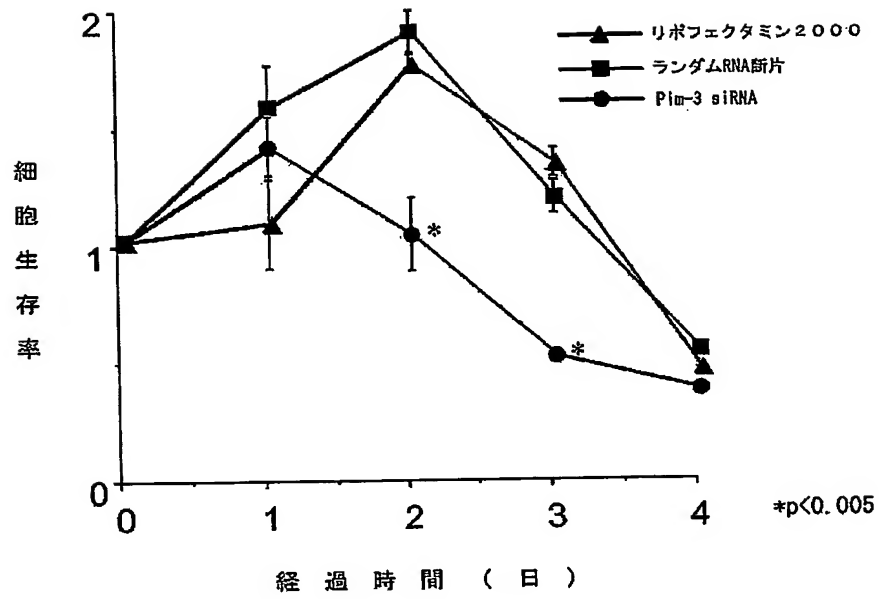


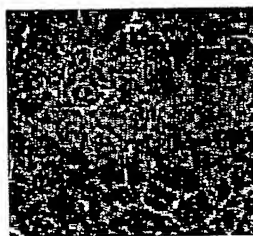
図 8

9]

ポリフェクタミン
単独処理



ランダムRNA断片



Pim-3 siRNA



図 9

101

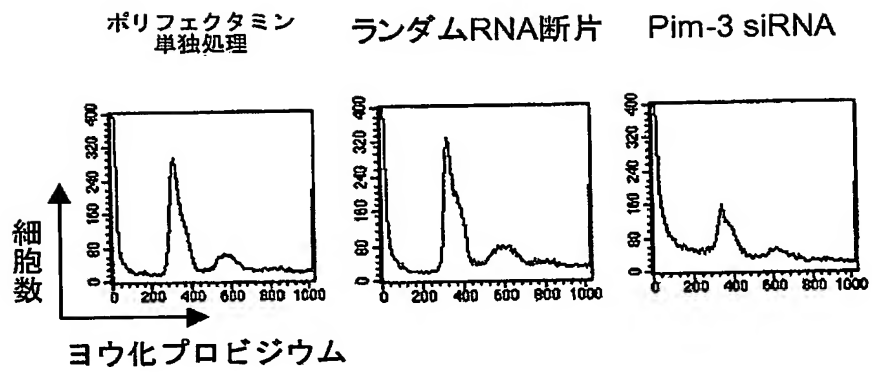


図 10

【類名】要約書

【要約】

【課題】 肝臓ガン特異的ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び該ポリペプチドの発現を抑制するRNA分子を提供する。

【解決手段】 配列番号1のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド、配列番号1のアミノ酸配列に対し、少なくとも80%の相同性を有し、かつ配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドに対する抗体産生を誘導する免疫原性を有するポリペプチド、及びこれらのヌクレオチド断片、該ポリペプチド及びその断片をコードするポリヌクレオチド、及び配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするmRNAに対応する部分配列を有するRNA分子。

【選択図】 なし

【氏名】 手続補正書
【整理番号】 0701011001
【提出日】 平成15年10月 7日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-291060
【補正をする者】
【識別番号】 000001100
【氏名又は名称】 呉羽化学工業株式会社
【代理人】
【識別番号】 100097456
【弁理士】
【氏名又は名称】 石川 徹
【手続補正1】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 発明者
【補正方法】 変更
【補正の内容】
【発明者】
【住所又は居所】 石川県金沢市平和町三丁目 1 7 番 1 4 号 平和宿舎 C 5 8 - 3 2
【氏名】 向田 直史
【発明者】
【住所又は居所】 石川県金沢市もりの里三丁目 3 9 番 ベル・ビュー I - 1 0 6 号
【氏名】 藤井 千文
【発明者】
【住所又は居所】 東京都練馬区春日町四丁目 8 番 1 6 号
【氏名】 広瀬 国孝
【手続補正2】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 特許出願人
【補正方法】 変更
【補正の内容】
【特許出願人】
【識別番号】 000001100
【氏名又は名称】 呉羽化学工業株式会社
【特許出願人】
【識別番号】 503289573
【住所又は居所】 石川県金沢市平和町三丁目 1 7 番 1 4 号 平和宿舎 C 5 8 - 3 2
【氏名又は名称】 向田 直史
【特許出願人】
【識別番号】 503289584
【住所又は居所】 石川県金沢市もりの里三丁目 3 9 番 ベル・ビュー I - 1 0 6 号
【氏名又は名称】 藤井 千文

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-291060
受付番号	50301666074
書類名	手続補正書
担当官	関 浩次 7475
作成日	平成 15 年 10 月 22 日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】

000001100

【住所又は居所】

東京都中央区日本橋堀留町 1 丁目 9 番 11 号

【氏名又は名称】

呉羽化学工業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100097456

【住所又は居所】

神奈川県相模原市相生 1-11-7 M B C ビル 1

F テクノフジ特許事務所

【氏名又は名称】

石川 徹

特願 2 0 0 3 - 2 9 1 0 6 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 1 0 0]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋堀留町 1 丁目 9 番 1 1 号

氏 名

呉羽化学工業株式会社

特願 2003-291060

出願人履歴情報

識別番号

[503289573]

1. 変更年月日

2003年 8月11日

[変更理由]

新規登録

住 所

石川県金沢市平和町三丁目17番1号 平和宿舎L58-32

氏 名

向田 直史

2. 変更年月日

2003年10月 7日

[変更理由]

住所変更

住 所

石川県金沢市平和町三丁目17番14号 平和宿舎C58-3

2

氏 名

向田 直史

特願 2003-291060

出願人履歴情報

識別番号 [503289584]

1. 変更年月日 2003年 8月11日

[変更理由] 新規登録

住 所 石川県金沢市もりの里三丁目39番 ベル・ビューⅠ-106
号

氏 名 藤井 千文

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.